

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 2 月 21 日 (21.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/14506 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C12Q 1/68 // A01H 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07052
- (22) 国際出願日: 2001 年 8 月 16 日 (16.08.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-247204 2000 年 8 月 17 日 (17.08.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP). シンジェンタ リミテッド (SYNGENTA LIMITED) [GB/GB]; GU27 3JE サリー ヘーゼルミア ファーン ハースト Fernhurst (GB).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小森俊之 (KOMORI, Toshiyuki) [JP/JP]. 山本敏央 (YAMAMOTO, Toshio) [JP/JP]. 新田直人 (NITTA, Naoto) [JP/JP]. 竹森尚樹 (TAKEMORI, Naoki) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会社 オリノバ内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.) ; 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ESTIMATING THE GENOTYPE OF FERTILITY RECOVERY LOCUS TO RICE BT TYPE MALE FERTILITY CYTOPLASM

(54) 発明の名称: イネBT型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子座の遺伝子型を推定する方法

(57) Abstract: A method of detecting a fertility recovery gene (Rf-1 gene) of a rice individual to BT type male fertility cytoplasm which is employed in growing a hybrid rice plant. More particularly, a method of detecting the Rf-1 gene by using the fact that plural PCR marker loci located around the Rf-1 locus are linked to the Rf-1 locus. Still particularly, the presence/absence of the Rf-1 gene is examined and an Rf-1 gene homo-individual is selected conveniently and exactly by calibrating the genotypes of plural PCR marker loci existing therearound by taking advantage of the fact that the Rf-1 locus is located between novel PCR marker loci S12564 Tsp509I and C1362 MwoI existing on the rice 10th chromosome.

(57) 要約:

本発明は、ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するイネ個体の稔性回復遺伝子 (Rf-1遺伝子) を検出する方法に関する。より具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座の近傍に存在する複数のPCRマーカー座が、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法に関する。さらに具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上に存在する新規のPCRマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する複数のPCRマーカー座の遺伝子型を検定することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施することに関する。



PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

イネBT型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子座の遺伝子型を  
推定する方法

5

## 発明の属する分野

本発明は、ジャポニカ米-ジャポニカ米ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するイネ個体の稔性回復遺伝子（Rf-1遺伝子）を検出する方法に関する。

10

より具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上に存在するDNAマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在するPCRマーカーを検出することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する方法に関する。

15

## 従来の技術

イネは自殖性植物であるため、品種間で交雑を行う場合には、まず自家受精を避けるためにイネの穎花が開花する直前に穎花内の雄しべを全て取り除き、次いで交雑をする花粉親品種由来の花粉を用いて受精させる必要がある。しかしながら、このような手作業による交雑方法で商業的規模での大量の雑種種子の生産をすることは不可能である。

20

そこで、ハイブリッドライスの生産には、細胞質雄性不稔を利用する三系法が利用されている。三系法とは、雄性不稔細胞質を保有する系統である不稔系統、Rf-1遺伝子を保有する系統である回復系統、および核遺伝子是不稔系統と同一であって不稔細胞質を保有しない系統である維持系統とを使用する方法をいう。これらの3品種を用いて、(i)不稔系統に回復系統の花粉を受精させることによりハイブリッド種子を獲得することができ、(ii)一方、不稔系統に維持系統の花粉を受精させることにより不稔系統を維持することができる。

25

三系法でBT型雄性不稔細胞質を利用するにあたっては、回復系統のイネを育成するために、育種における各過程で育成中のイネがRf-1遺伝子を保有すること、

また、最終段階ではRf-1遺伝子をホモで保有することを確認する必要がある。また、三系法において、回復系統に使用する品種が確実にRf-1遺伝子を保有することを調べたり、得られたハイブリッド種子が稔性を回復しているか確認するためには、Rf-1遺伝子の存在を調べる必要が生じる場合もある。

- 5 従来、植物体中でのRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定するためには、まず、検定系統と交配を行った交配種子から植物体(F1)を形成し、次いでF1植物を自殖させてその種子の形成率が一定以上（例えば70～80%以上）である個体の出現頻度を調査する必要があった。なお、検定系統とは、維持系統、不稔系統あるいは両系統のセットを指し、目的とする被検定個体の細胞質がBT型か通常細胞質か、  
10 あるいは不明かにより適宜選択するものである。不稔系統の場合は母親として、維持系統の場合は父親として、それぞれ被検定個体に交配する。

しかしながら、これらの方法を行うには、莫大な労力と時間を要する。また、種子稔性は、環境要因の影響を受けやすいので、低温・日照不足などの不良環境で調査すれば、遺伝子型の構成によらず不稔になる場合があり、Rf-1遺伝子座の  
15 遺伝子型推定が正確に行えないという問題を有していた。

このような問題を解消するために、最近では、分子生物学的方法によりRf-1遺伝子の存在を判別する方法も提案されている。それは、Rf-1遺伝子と連鎖する塩基配列（以下、DNA マーカーという）を検出することにより、Rf-1遺伝子の存在  
20 または不存在を調べる方法である。因みに、Rf-1遺伝子のDNA配列は未解読であるため、直接Rf-1遺伝子を検出することは、現在の技術では不可能である。

例えば、イネのRf-1遺伝子座は第10染色体上に存在し、そして、制限酵素断片長多型（RFLP）解析に使用することができるDNAマーカー（RFLPマーカー）座G291とG127との間であることが報告されている（Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl. 1) 164-165）。このように、Rf-1遺伝子と連鎖するDNAマーカー座G  
25 291およびG127の遺伝子型を調査することにより、Rf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する方法が知られている。

しかしながら、従来の分子生物学的方法にはいくつかの問題が存在する。第一の問題は、従来の方法では、使用するマーカーがRFLPマーカーであり、これを検出するためにはサザンブロット解析を行う必要があるという点である。サザンブ

ロット解析を行うためには、被検定個体から数マイクログラム単位のDNAの精製を必要とし、さらに制限酵素処理、電気泳動、ブロッキング、プローブとのハイブリダイゼーション、およびシグナルの検出からなる一連の作業手順を行う必要があるため、多大な労力が必要であるうえに、検定結果を得るまでに1週間程度かかっていた。

第二の問題は、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子地図距離は約30 cM（イネDNAでは約9000 kbpに相当する）と長いと、二重組換えが起こる可能性が数%程度はあると考えられ、Rf-1遺伝子座の遺伝子型が必ずしも正確に推定できないことである。

さらに第三の問題は、Rf-1遺伝子の存在をRFLPマーカー座G291およびG127を検出することにより推定する場合、育種の結果選抜される稔性回復系統には、Rf-1遺伝子と共に、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子領域も導入されるという点である。その結果、導入DNA配列は30 cM以上のRf-1遺伝子ドナー親由来の染色体領域を有することになり、導入DNA領域中に存在する可能性がある劣悪遺伝子をRf-1遺伝子と同時に導入してしまう危険性があった。

このような問題を解決するため、Rf-1遺伝子座と連鎖する優性DNAマーカー（特開平7-222588）および共優性DNAマーカー（特開平9-313187）が開発されている。これらのマーカーは、Rf-1遺伝子座とそれぞれ、 $1.6 \pm 0.7$  cM（イネDNAでは約480 kbpに相当）および $3.7 \pm 1.1$  cM（イネDNAでは約1110 kbpに相当）の遺伝距離で連鎖しており、両座はRf-1遺伝子座を挟む位置関係にある。そのため、優性PCRマーカー座および共優性PCRマーカー座は、これらが両方とも存在することを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を推定することができる。また、共優性PCRマーカーの使用は、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がホモかヘテロかも推定することを可能にする。

しかしながら、これらのPCRマーカーを使用する場合にも、依然としていくつかの問題がある。この共優性マーカーはRf-1遺伝子座と $3.7 \pm 1.1$  cMの遺伝距離を有するため、Rf-1遺伝子座との間での組換え頻度が高いという問題が十分には解決されていない。その結果、共優性マーカー自体についてはホモ型またはヘテロ型まで正確に検出することができるが、共優性マーカー座とRf-1遺伝子座との

間で組換えが生じる場合に、Rf-1遺伝子座の遺伝子型の推定、特にホモ型またはヘテロ型までの推定を正確に実施できないという問題がある。一方、優性マーカーを使用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する場合、優性マーカーではRf-1遺伝子がホモの個体 (Rf-1/Rf-1) およびヘテロの個体 (Rf-1/rf-1) の両方を区別  
5 することなく検出してしまう。そのため、上記共優性マーカーと優性マーカーとを組み合わせて利用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定したとしても、Rf-1遺伝子に関するホモ型とヘテロ型とを正確に識別することはできない。また、優性マーカーを用いて行うPCRでは、PCR産物が得られなかった場合には、実験操作上の問題に起因する可能性も否定できない。さらに、これらの共優性マーカーと優性  
10 マーカーとの間の遺伝子距離が約5.3 cM (約1590 kbp) と離れているため、Rf-1遺伝子ドナー親からの導入染色体領域長を短い長さに限定することができないので、この領域中に含まれる劣悪遺伝子の持ち込みを抑制できないという問題点も有している。

さらに、特開2000-139465号には、イネ第10染色体のRf-1遺伝子の近傍に座乗  
15 するRFLPマーカーの塩基配列に基づいて開発された、共優性PCRマーカーが記載されている。しかしながら、それらのPCRマーカーの多くは、Rf-1遺伝子からの遺伝子距離が約1cMより離れているという問題がある。

#### 発明の概要

20 本発明の目的は、Rf-1遺伝子座と密接に連鎖し、かつ、Rf-1遺伝子座を挟む位置関係にある複数の共優性PCRマーカーを開発することにより、Rf-1遺伝子座の存在及び、それがヘテロまたはホモのいずれで存在するかを簡便かつ正確に推定する方法を提供することである。

#### 25 図面の簡単な説明

図1は、第10染色体上でRf-1遺伝子座をマーカーとの関係で連鎖地図上に位置づけた、遺伝子地図を表したものである。地図距離は1042F1個体の分離データから算出した。

## 詳細な説明

本発明は、ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対する回復遺伝子であるRf-1遺伝子を検出する方法を提供する。より具体的には、本発明者らはRf-1遺伝子座の存在部位を第10染色体の極めて狭い範囲に特定した。  
5。本発明はその結果に基づいて、Rf-1遺伝子座の近傍に存在するPCRマーカを開発し、これらのPCRマーカが、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法を提供する。具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカ座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する新規のPCRマーカを検出することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する。

マーカ

Rf-1遺伝子座の近傍に存在する特定の領域に対して設計したプライマー対を用いてPCRを行い、その産物を特定の制限酵素で処理後電気泳動にかけると、ジャポニカ系統とインディカ系統との間で、異なる大きさのバンドが観察されることがある。その用な場合、本明細書においては、インディカ系統に特徴的なバンドをRf-1連鎖バンドとする。本発明により、Rf-1遺伝子座は、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカ座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することが明らかになったので、その周辺でのPCRマーカは、当業者が適宜開発して使用可能である。

例えば、本発明は下記の群から選択されるPCRマーカの少なくとも1個を被検体イネのゲノム中に存在するか否か検出することにより、被検定個体がこれらのPCRマーカと連鎖するRf-1遺伝子を持つか否かを識別する：

(1) マーカ 1： SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素EcoRI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカ-R1877 EcoRI；

(2) マーカ 2： SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の配列を有するDNAをプラ

イマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素HindIII認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG4003 HindIII (SEQ ID NO:19) ;

(3) マーカー 3: SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーC1361 MwoI (SEQ ID NO:20) ;

(4) マーカー 4: SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) ;

(5) マーカー 5: SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MspI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG291 MspI (SEQ ID NO:22) ;

(6) マーカー 6: SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BslI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーR2303 BslI (SEQ ID NO:23) ;

(7) マーカー 7: SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BstUI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10019 BstUI (SEQ ID NO:24) ;

(8) マーカー 8: SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素KpnI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10602 KpnI (SEQ ID NO:25) ; および

(9) マーカー 9: SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Tsp50



9I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS12564 Tsp509I (SEQ ID NO:26)。

5 なお、上記PCRマーカーは、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上の9個のRFLPマーカー領域R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、およびG2155付近に座乗する可能性が高いと考え (Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl. 1) 164-165によるRFLP連鎖解析結果、およびHarushima et al. 1998, Genetics 148 479-494によるイネRFLP連鎖地図を参照)、これらのRFLPマーカーを、後記実施例1に記載するようにして、共優性PCRマーカーであるCAPSマーカーまたはdCAPSマーカー (Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14(3) 381-385; Neff et al. 1998, The Plant Journal 14(3) 387-392) に変換した。この変換により、上記PCRマーカーが得られた。

10 これらのPCRマーカーのうち、PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI (SEQ ID NO:22)、R2303 BslI (SEQ ID NO:23) およびS12564 Tsp509I (SEQ ID NO:26) からなる群と、PCRマーカーC1361 MwoI (SEQ ID NO:20)、S10019 BstUI (SEQ ID NO:24)、G4003 HindIII (SEQ ID NO:19)、S10602 KpnI (SEQ ID NO:25)、およびG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) からなる群とは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟んで反対側に存在する。したがって、本発明の好ましい態様としては、(a) PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 BslIおよびS12564 Tsp509Iからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカー、および(b) PCRマーカーC1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnI、およびG2155 MwoIからなる群から選択される、各々少なくとも1個のPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を検出する。その際、上記(a) の群からRf-1遺伝子に最も近いマーカーとして、少なくともPCRマーカーS12564 Tsp509I および上記(b) の群から少なくともC1361 MwoIを使用することが好ましい。被検  
20 定イネのゲノム中に、(a) のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドと(b) のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドの両方が検出されれば、そのイネがRf-1遺伝子を有する可能性を極めて高い確率で推定することができる。

25 本発明の別の態様においては、上記(a) の群から少なくとも二つのPCRマーカー、及び(b) の群から少なくとも二つのPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検

出する。例えば、(a) 及び(b) の群のマーカーのうち、図1に示す遺伝子地図において、Rf-1遺伝子により近いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出され、それよりRf-1遺伝子から遠いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出されないイネ個体を選抜することにより、Rf-1遺伝子を有するが、不要な遺伝子領域をできるだけ含まないイネを選抜することが可能である。この場合も、(a) 及び(b) の各群のマーカーのうち少なくとも一つは、それぞれPCRマーカーS12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIであることが好ましい。すなわち、2種のPCRマーカー座S12564 Tsp509 IとC1361 MwoIは、マーカー座間距離にして0.3 cMしか離れていない。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1 cM程度に狭めることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に存在する可能性がある劣悪遺伝子が回復系統に導入される可能性を最小限に抑えることができる。

#### プライマー

本発明は別の観点において、上記PCRマーカーを増幅するための下記プライマー対も提供する。これらのプライマー対も、実施例1の記載のようにして得られたものである。

(1) プライマー対1： PCRマーカーR1877 EcoRIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の塩基配列を有する。

(2) プライマー対2： G4003 HindIIIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の塩基配列を有する。

(3) プライマー対3： C1361 MwoIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の塩基配列を有する。

(4) プライマー対4： G2155 MwoIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の塩基配列を有する。

(5) プライマー対5： G291 MspIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の塩基配列を有する。

(6) プライマー対6： R2303 BslIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の塩基配列を有する。

(7) プライマー対 7: S10019 BstUIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の塩基配列を有する。

(8) プライマー対 8: S10602 KpnIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の塩基配列を有する。

5 (9) プライマー対 9: S12564 Tsp509Iを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の塩基配列を有する。

これらのプライマー対をそれぞれ用いることにより、それぞれ対応するPCRマーカ-をイネゲノムから増幅して検出することができる。さらに、これらの特定の塩基配列を含む若干長い塩基配列、あるいはこれら特定の塩基配列より若干短い塩基配列もプライマーとして使用することは、本発明の範囲に含まれる。

#### Rf-1遺伝子の検出

本発明の方法により、被検定イネゲノム中のRf-1遺伝子を検出するには、上記本発明のプライマーを用いて、被検定イネゲノムから上記PCRマーカ-のいずれかをPCRで増幅させ、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法で検出する。

PCR-RFLP法は、比較する品種系統間において、PCRにより増幅したDNA断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを簡便に決定する方法である (D.E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97:327-336)。

PCRの鋳型として使用する被検定イネゲノムのDNAは、Edwardsら(Nucleic Acids Res. 8(6): 1349, 1991)の方法で簡易に抽出することができる。より好ましくは、標準的な方法により精製したDNAを用いるのがよい。CTAB法(Murray M.G., et al., Nucleic Acids Res. 8(19):4321-5, 1980)は、特に好ましい抽出法である。PCRを行うための鋳型として使用するDNAの濃度は、終濃度で0.5ng/ $\mu$ l が好ましい。

PCRの方法はよく知られている。例えば、鋳型として使用するゲノムDNA50ng、dNTP各200  $\mu$ M、ExTaq<sup>TM</sup>(TAKARA)5Uを使用し、例えば、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとして30サイク

ル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うことができる。あるいは、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。あるいは、別の態様においては、94℃にて2分を1サイ

5 クル行った後、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。

得られたPCR産物を、制限酵素断片長多型に関して調べるため、それぞれのPCR

10 マーカーに存在する制限部位に対応する制限酵素で切断する。この切断は、用いる制限酵素の推奨反応温度で数時間～一昼夜インキュベーションすることにより行う。制限酵素で切断したそれぞれの増幅PCRサンプルは、例えば約0.7%ないし2%アガロースゲルあるいは約3%のMetaPhor™アガロースゲルで電気泳動することにより解析する。例えば、ゲルをエチジウムブロマイド中紫外線下で可視化する。

15 可視化されたゲル上に、使用したプライマー対に応じて、次のようなバンドが存在するか確認する。

表 1

	検出されるバンドの おおよそのサイズ(bp)
プライマー対 1 によるマーカー 1 の検出(R1877 EcoRI) 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 1500及び1700 25 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 1500、1700及び3200 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 3200	

プライマー対 2 によるマーカー 2 の検出(G4003 HindIII)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 362

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 95、267 及び362

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 95及び267

---

プライマー対 3 によるマーカー 3 の検出(C1361 MwoI)

5 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 50及び107

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、50、79及び107

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25、50及び79

---

プライマー対 4 によるマーカー 4 の検出(G2155 MwoI)

10 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、27及び78

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、27、78及び105

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び105

---

プライマー対 5 によるマーカー 5 の検出(G291 MspI)

15 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、49及び55

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、49、55及び104

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び104

---

プライマー対 6 によるマーカー 6 の検出(R2303 BslI)

20 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 238 、655 及び679

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 238 、655 、679

及び1334

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 238 及び1334

---

25 プライマー対 7 によるマーカー 7 の検出(S10019 BstUI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 130 、218 及び244

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 130 、218 、244

及び462

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 130 及び462

プライマー対 8 によるマーカー 8 の検出(S10602 KpnI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合：117、607 及び724

5 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 117 及び607

プライマー対 9 によるマーカー 9 の検出(S12564 Tsp509I)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 41及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合：26、41、91及び117

10 被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 26、41及び91

#### 発明の効果

(1) 本発明の方法は、PCR-RFLP法を用い、検出しようとするマーカーのDNAをP  
15 CRにより増幅するため、サザンブロット解析を行わずに、短時間で簡便に検出  
することができる。サザンブロット解析を行うRFLP法と比較して、PCR-RFLP法にお  
いて使用するDNAの量は数ナノグラム程度と極めて少量でもよいという利点もあ  
る。また、使用するDNAの精製度は、それほど高くなくてもよく、DNAの粗抽出液  
をそのまま使用することもできる。本発明においては、検出するPCRマーカーの  
20 存在をより確実に調べるため、PCR-RFLP法と配列決定とを組み合わせ使用して  
もよい。

(2) 本発明のPCRマーカーは、全て共優性マーカーである。共優性マーカーと  
は、ヘテロ個体と優性ホモ個体を識別することができるマーカーのことをいう。  
ヘテロ遺伝子型個体同士を交配して得られた交雑体の遺伝子型分離比を検出する  
25 場合、優性遺伝子を保有しているか否かのみを識別することができるマーカーで  
ある優性マーカーを使用したのでは、優性形質を有する個体と劣性形質を有する  
個体とを3：1の比率で区別することしかできないのに対して、共優性マーカーを  
使用する場合には、優性ホモ個体：ヘテロ個体：劣性ホモ個体を1：2：1の比率  
で検出することができる。したがって、本発明で開示された9種類の共優性マ-

カーのうち、Rf-1遺伝子座を挟むように存在する2種の共優性マーカーを使用して、その遺伝子型を識別することにより、導入する遺伝子であるRf-1遺伝子の遺伝子型を、ホモかヘテロか（すなわち、Rf-1/Rf-1、Rf-1/rf-1、またはrf-1/rf-1のいずれであるか）まで正確に識別することができる。

- 5       例えば、PCRマーカーS12564 Tsp509IとC1361 MwoIを用いる検定を例に説明すると、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がヘテロである場合には、Rf-1遺伝子は制限酵素Tsp509Iで切断されないS12564マーカー領域および制限酵素MwoIで切断されないC1361マーカー領域と連鎖しており、もう一方のアリル上に存在するrf-1遺伝子は制限酵素Tsp509Iで切断されるS12564 Tsp509Iマーカーおよび制限酵素MwoIで切断されるC1361 MwoIマーカーと連鎖している。その結果、それぞれのマーカーについてPCRを行うことにより、S12564マーカーについては制限酵素Tsp509I部位に多型を有する二種類のPCR生成物が増幅され、そしてC1361マーカー領域については制限酵素MwoI部位に多型を有する二種類のPCR生成物が増幅される。それぞれの二種類ずつのPCR生成物を対応する制限酵素を用いて切断することにより、ホモ型の場合と比較して異なる制限酵素断片パターンが示される。
- 10
- 15

- (3) PCRマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoIとは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟むように存在し、かつPCRマーカー座S12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIとRf-1遺伝子との遺伝距離が、それぞれ0.1 cM（約30 kbpsに相当する）および0.2 cM（約60 kbpsに相当する）と近接する。減数分裂時に1個所で乗り換えが起
- 20       こるとその周辺では乗り換えが生じにくくなるキアズマ干渉を考慮すると、0.3 cMのマーカー座間距離しか離れていない両マーカー座間で二重乗り換えが起こる可能性はほとんど考えられない。したがって、両マーカー座の遺伝子型を調査することにより、その間に位置するRf-1遺伝子座の遺伝子型を正確に推定できることが示される。

- 25       なお、本明細書において、遺伝距離はcM（センチモルガン）を単位として記載する。1cMとは、組換え率が1%である遺伝的距離、すなわち、全配偶子の1%が2遺伝子座間において組換えを生じるような遺伝的距離である。組換えを起こす確率は種ごとに大きく異なるため、1 cMに対応する塩基対数は種ごとに異なる。本発明で使用するイネの場合には、染色体上の位置によっても異なるが、平均すると

、1 cMはDNAの約300 kbpsに相当することが知られている。

(4) 前述したように、本発明に開示するRf-1遺伝子座と密接に連鎖する2種のPCRマーカーS12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座は、マーカー座間距離にして0.3 cMしか離れていない。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1 cM程度にすることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に劣悪遺伝子が存在しても、Rf-1遺伝子と同時に導入される劣悪遺伝子を効率よく識別することができるため、そのような劣悪遺伝子が回復系統に導入されてしまう可能性を非常に低くすることができる。したがって、本発明のPCRマーカーS12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座とを利用することにより、30 cM以上の地図距離を有する従来のマーカー座G291座およびG127座を使用する場合と比較して、劣悪遺伝子が導入される可能性を1/30以下に減少することができる。

(5) 本発明の別の態様においては、本発明のPCRマーカーは、ジャポニカ米とインディカ米とを区別するために使用することもできる。上述したように、本発明のPCRマーカーは、ジャポニカ米とインディカ米との間で制限酵素部位の配列に塩基多型が存在することを利用して、両種を識別することができるマーカーである。例えば、種籾の中にジャポニカ米とインディカ米が混在すると、栽培した結果所望の品種の米を収穫することができなくなるなど、ジャポニカ米とインディカ米とを区別することは重要になる。本発明の方法では、数ナノグラム程度のDNAを用いてPCRマーカーの増幅を行うことができるため、種籾1粒ごとに識別することができる。

本発明を以下の実施例において説明するが、これらは本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するためのものではない。

#### 実施例1 Rf-1 遺伝子座周辺RFLPマーカーのPCRマーカー化

本実施例においては、Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個 (R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、G2155) をPCRマーカー化した。

##### (1) 材料および方法

Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個 (R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、G2155) を農林水産省農業生物資源研究所から購入し、ベ



クター内の挿入塩基配列を決定した後、以下の手順で実験を行った。なお、本文中のイネ品種のうち、あそみのり、コシヒカリおよび日本晴はジャポニカ米であり、IR24およびKasalathはインディカ米である。

## (2) あそみのりゲノミックライブラリーの作製

5 あそみのり緑葉から、CTAB法によりトータルDNAを抽出した。MboIで部分消化後、NaCl密度勾配遠心（6～20%直線勾配、20℃、37000 rpm、4時間、全容量12 ml）によりサイズ分画を行った。各分画（約0.5 ml）の一部を電気泳動にかけ、15～20kbのDNAを含む分画を選抜・精製した。ライブラリーの作製は、Lambda D ASH II（Stratagene）をベクターに用いて、付属プロトコルに準拠して行った。  
10 。パッケージングには、Giga Pack III Gold（Stratagene）を用いた。パッケージング後、SM Buffer 500  $\mu$ lおよびクロロフォルム20  $\mu$ lを添加した。遠心後の上清にクロロフォルム20  $\mu$ lを添加し、ライブラリー溶液とした。

ライブラリー溶液の50倍希釈液5  $\mu$ lを用いて、XL-1 Blue MRA(P2)に感染させた結果、83個のプラークが出現した。ライブラリーあたりでは、 $4.15 \times 10^5$  pfu  
15 となり、平均挿入断片長を20 kbとすると、 $8.3 \times 10^9$  bpをカバーする計算になる。イネゲノム（ $4 \times 10^8$  bp）に対して十分な大きさのライブラリーであると考えられた。

## (3) R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククロンの単離

C1361およびG4003については、RFLPマーカープローブを含むプラスミドを単離  
20 した後、制限酵素処理・電気泳動により、RFLPマーカープローブ部分を分離し、DNA回収フィルター（Takara SUPREC-01）を用いて目的のDNAを回収した。R1877については、マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、前述の方法で回収した。回収したDNAは、rediprime DNA labelling system（Amersham Pharmacia  
25 ）を用いてラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブとした。なお、PCRは常法により行った（以下、同様）。

ライブラリーのスクリーニングは、プラークをHybond-N+（Amersham Pharmacia）にブロットした後、常法により行った。1stスクリーニング後、陽性プラーク周辺を打ち抜き、SMバッファーに懸濁し、2ndスクリーニングに供試した。2ndス

クリーニング後、陽性プラークを打ち抜き、さらに3rdスクリーニングを行い、単一プラークを分離した。

分離した目的プラークをSMバッファーに懸濁後、プレートライセート法によりファージを一次増殖した。得られたファージ増殖液を用いて、振とう培養法により二次増殖を行った後、Lambda starter kit (QIAGEN) を用いてファージDNAを精製した。

各マーカーについて、8枚のプレートを用いて1stスクリーニングを行った。プレート1枚につきライブラリー溶液を10  $\mu$  l使用した。3rdスクリーニングまで行った結果、R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククローンを、それぞれ、4個、3個および3個単離した。

#### (4) R1877のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

単離した4クローンについて以下の解析を行った。

まず、T3およびT7プライマーを用いて、各クローンの挿入断片の両末端の塩基配列を明らかにした。

つぎに、マーカープローブ両端部に対して外向きのプライマーを設計し、T3およびT7プライマーと組み合わせ（合計4プライマー組合せ）、各クローンをテンプレートにPCRを行った。

また、各クローンをNotIおよびEcoRIで消化した後、電気泳動することにより、挿入断片長および各EcoRI断片長を推定した。

これらの解析の結果、各クローンの位置関係を明らかにすることができた。RFLP解析ではマーカープローブRI877により日本晴では20 kb、Kasalathでは6.4kbのEcoRI断片が検出されること(<ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG>) と併せ考えることにより、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位のおおよその位置が推定できた。そこで、その周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ (SEQ ID NO:1×SEQ ID NO:2) を用いて、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとし30サイクル

のPCR条件にてゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をEcoRI処理した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。その結果、あそみのり-IR24間で期待通りの多型が観察された。すなわち、PCR産物（約3200bp）のEcoRI 処理により、IR24では1500bpと1700bpとに切断されるのに対し、あそみのりでは切断されなかった。  
5 。あそみのり-IR24のRIL（Recombinant Inbred Line）を用いてこのPCRマーカーをマッピングした結果、RFLPマーカー座R1877と同一領域に位置づけられ、RFLPマーカーR1877がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはR1877 EcoRIと命名した。

(5) G4003のPCRマーカー化

10 単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンの位置関係を明らかにした。RFLP解析ではマーカープローブG4003により日本晴では3kb、Kasalathでは10kbのHindIII断片が検出されること(ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parents  
15 outhern/chr10/R1877.JPG) と併せ考えることにより、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位が、2個の候補部位のいずれかであると推定された。そこで、各HindIII部位周辺を増幅するように設計したプライマー組合せを用いて、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクル  
20 の条件で、ゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をHindIII処理後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、マーカープローブ内部のHindIII部位が多型部位であることが示された。すなわち、PCR産物(362bp)のHindIII処理により、あそみのりでは95bpと267bpとに切断されるのに対し、IR24では切断されなかった。多型部位を増幅するためのプライマーはSEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4である。  
25 マッピングの結果、RFLPマーカーG4003がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG4003 HindIII (SEQ ID NO:19) と命名した。

(6) C1361のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンの塩基配列情報に基づいてプライマーを設計した

。あそみのり、コシヒカリ、KasalathおよびIR24のトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、既述の方法で回収した。回収したDNAをテンプレートに用いて、ABI Model 310により各品種の塩基配列を解読し、多型作出に利用可能な変異を探索した。

- 5 R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンのおおよその位置関係を明らかにすることはできた。しかし、C1361マーカー周辺にはPCR増幅しにくい領域や塩基配列を解読できない領域が存在することが明らかになり、RFLP原因部位を同定することは困難であると考えられた。そこで、比較的長いPCR産物 (2.7kb) が得られる領域に着目し、dCAPS化を試みることにした。あそみのり、コシヒカリ、K
- 10 asalath、IR24を用いて、同領域のゲノミックPCR産物の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間で多型を示す部位を6ヶ所見出すことができた。そのうちのひとつについて、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物を
- 15 MwoI処理後、3%MetaPhor™アガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは2箇所切断され、約25bp、50bp、79bpのバンドが観察され、IR24では1箇所切断され、約50bp、107bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーC1361がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはC1361 MwoI (SEQ ID NO:20) と命名した。

20 (7) G2155のPCRマーカー化

マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216 (戻し交雑によりコシヒカリにRf-1遺伝子を導入した系統、遺伝子型はRf-1/Rf-1) のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

- 25 供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、Rf-1遺伝子保有品種・系統 (IR24およびIL216) - Rf-1遺伝子非保有品種 (あそみのりおよびコシヒカリ) 間の変異が3ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCR

を行った。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhor™アガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは1箇所切断され、約25bp、105bpのバンドが観察され、IR24では2箇所切断され、約25bp、27bp、78bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG2155がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) と命名した。

#### (8) G291のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、種々のプライマー組合せでPCRを行い、期待される大きさの増幅産物が得られるプライマー組合せを探索した。探索により見出したプライマー組合せで、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

マーカープローブ配列に対して設計したプライマーを用いて、供試品種のゲノミックPCRを行い、産物の塩基配列を比較した。その結果、Rf-1遺伝子保有品種・系統 (IR24およびIL216) - Rf-1遺伝子非保有品種 (あそみのりおよびコシヒカリ) 間の変異が4ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMspI処理後、3%MetaPhor™アガロースで電気泳動することにより解析した。Rf-1遺伝子保有品種・系統では2箇所切断され、約25bp、49bp、55bpのバンドが観察され、Rf-1遺伝子非保有品種では1箇所切断され、約25bp、104bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG291がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG291 MspI (SEQ ID NO:22) と命名した。

#### (9) R2303のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、あそみのり、IR24およびKasalathのトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米

間の変異が見出された。この変異は、Bs1I認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をBs1I処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約238bp、1334bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約238bp、655bp、679bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーR2303がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはR2303 Bs1I (SEQ ID NO:23) と命名した。

(10) S10019のPCRマーカー化

S10019のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。この変異は、BstUI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をBstUI 処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約130bp、462bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約130bp、218bp、244bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカー-S10019がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはBstUI (SEQ ID NO:24) と命名した。

(11) S10602のPCRマーカー化

S10602のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、CAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし33サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をKpnI処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約117bp、607bpのバンドが観察され、

インディカ米では切断されず、724bp のバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10602がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはS10602 KpnI (SEQ ID NO:25) と命名した。

(12) S12564のPCRマーカー化

5 S12564のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。  
10 。得られたPCR産物をTsp509I処理後、3%MetaPhor<sup>TM</sup>アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では2箇所切断され、26bp、41bp、91bpのバンドが観察され、インディカ米では1箇所切断され、41bp、117bp のバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS12564がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはTsp509I (SEQ ID NO:26  
15 ) と命名した。

実施例2 Rf-1遺伝子座のマッピング

MSコシヒカリにMS-FRコシヒカリの花粉をかけて作成したF1集団1042個体の幼苗からDNAを抽出し、分析に供試した。ここで、MSコシヒカリとは、細胞質をBT型雄性不稔細胞質に置換したコシヒカリである (世代:BC10F1) 。また、MS-FRコシヒカリとは、IR8に由来するRf-1遺伝子をMSコシヒカリに導入した系統である (Rf-1遺伝子座ヘテロ) 。  
20

まず、Rf-1遺伝子座を挟むと考えられる2個のマーカー座R1877 EcoRIおよびG2155 MwoIにおける各個体の遺伝子型を調査した。R1877 EcoRI座またはG2155 MwoI座に関してジャポニカ米型ホモ個体を、これら2マーカー座間での組換え体とみなした。つぎに、各組換え体について、G291 MspI座、R2303 BslI座、S12564 Tsp509I座、C1361 MwoI座、S10019 BstUI座、G4003 HindIII座およびS10602 KpnI座の遺伝子型を調査し、組換え位置を同定した。  
25

R1877 EcoRI座およびG2155 MwoI座に関する遺伝子型調査の結果、46個体がRf-1遺伝子座付近での組換え体であることが明らかになった。これら組換え体につ

いて、Rf-1遺伝子座近傍マーカー座の遺伝子型を調査した結果を表2に示す。上記交配において、BT型雄性不稔細胞質を持つ個体では、Rf-1遺伝子をもつ花粉のみが受精能力を持つとの報告(C. Shinjyo, JAPAN. J. GENETICS Vol. 44, No. 3:149-156(1969))に基づいて、Rf-1遺伝子座を詳細連鎖地図上に位置づけることができた(図1)。

5

10

15

20

25



表2 *Rf-1* 座近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
R1877 EcoRI	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G291 MspI	H	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R2303 BstI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S12564 Tsp509I	H	H	H	H	H	H	H	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
C1361 MwoI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H
S10019 BstUI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H
G4003 HindIII	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
S10602 KpnI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
G2155 MwoI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J

J コシヒカリ型ホモ  
H コシヒカリ型/MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

本発明において、Rf-1遺伝子座と密接に連鎖するマーカー座の遺伝子型を検定するために、Rf-1遺伝子座を挟む位置関係にある新規の共優性PCRマーカーS12564 Tsp509IとC1361 MwoIを含む、9個の新規の共優性PCRマーカーを開発した。これらの新規の共優性PCRマーカーによりRf-1遺伝子座の遺伝子型を、簡便かつ正確に推定する方法を提供することができる。本発明のPCRマーカーを使用すると、ジャポニカ米-ジャポニカ米ハイブリッドライスの育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するRf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施できた。したがって、本発明のPCRマーカーは効率的にハイブリッドライスの育成に利用することができる。さらに、本発明の方法では、遺伝子型をDNA配列から直接的に検出するため、環境要因の影響を受けることなく、Rf-1遺伝子座の遺伝子型を決定することができる。

15

20

25

## 請求の範囲

1. 稔性回復遺伝子 (Rf-1遺伝子) 座がイネ第10染色体上のRFLPマーカー座S1  
2564座とC1361座との間に座乗することを利用して、被検定イネ個体または種子  
5 がRf-1遺伝子を持つか否かを識別する方法。

2. 次のPCRマーカー：

(1) SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素EcoRI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、  
10 PCRマーカーR1877 EcoRI；

(2) SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素HindIII認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、  
PCRマーカーG4003 HindIII；

15 (3) SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、  
PCRマーカーC1361 MwoI；

20 (4) SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、  
PCRマーカーG2155 MwoI；

25 (5) SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MspI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、  
PCRマーカーG291 MspI；

(6) SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BslI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する

、PCRマーカーR2303 BslI；

(7) SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BstUI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する

5 、PCRマーカーS10019 BstUI；

(8) SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素KpnI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10602 KpnI；および

10 (9) SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Tsp509I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS12564 Tsp509I；

15 からなる群から選択されるPCRマーカーの少なくとも1個を検出することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

3. (a) PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 BslIおよびS12564 Tsp509Iからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカー、および、(b) PCRマーカーC1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnIおよびG2155 MwoIからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカーの両者が増幅産物中に存在する場合に、被検定イネ植物個体または種子がRf-1遺伝子を有すると判断する、請求項2に記載の方法。

20 4. PCRマーカーS12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIの存在を調べることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

25 5. 請求項3に記載した(a) 及び(b) のうちの少なくとも一方の群のPCRマーカーの2個以上を用いて、被検定個体のRf-1遺伝子座周辺遺伝子座の遺伝子型を検定することにより、Rf-1遺伝子ドナー親由来の導入染色体領域を調べる方法。

6. SEQ ID NO:1～18のいずれか1つの配列を有する、請求項2の方法に使用するプライマー。

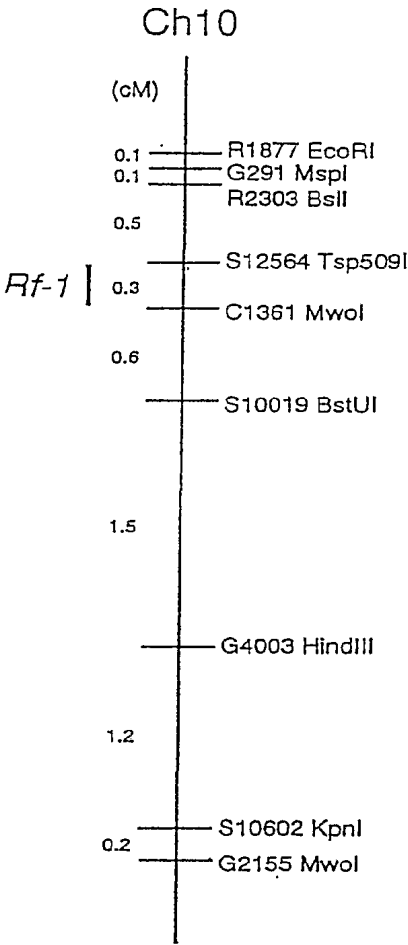


図1. Rf-1座の推定座乗位置

## Sequence Listing

<110> JAPAN TOBACCO INC.

<120> A method for genotyping the locus which is involved in restoration of the rice BT type cytoplasmic male sterility.

<130> 991698

<160> 26

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 1

cattcctgct tccatggaaa cgtc 24

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 2

ctcttttctgt atacttgagc ttgacatct gac 33

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 3

gatcgacgag tacctgaacg

20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 4

aatagttgga ttgtcctcaa aggg

24

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 5

aaagcaaccg acttcagtgg catcacc

27

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker

sequence.

<400> 6

ctggacttca tttccctgca gagg

24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 7

gaccaccaat taactgatta agctggc

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 8

tttctggctc caataatcag ctgtagc

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.

<400> 9



ctgctgcagc aagctgcacc gaaccgg

27

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.

<400> 10

acattttttc ttccgaaact tccg

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 11

atggaaagat acactagaat gagc

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 12

atcttatata gtggcaggaa agcc

24

- <210> 13  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.  
<400> 13  
aacaatctta tcctgcacag actg 24
- <210> 14  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.  
<400> 14  
gtcâcataga agcagatggg ttcc 24
- <210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.  
<400> 15  
agctgttgag agttctatgc cacc 24
- <210> 16  
<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.

<400> 16

tagccatgca acaagatgtc atac

24

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.

<400> 17

ctagtttagac cgaataactg aggttc

26

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.

<400> 18

tttgtgggtt tgtggcattg agaaaat

27

<210> 19

<211> 2240

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

&lt;223&gt; PCR marker G4003 HindIII

&lt;400&gt; 19

gcggccgctc cgggaagtcg agcgagtaga cgcccctgac gccgtacgcg tcggcgagcc 60  
 gcagcggcgt ctctggcggg gtgaaggaca gcccgttcag cgtcgcgcgg cgccgcccgt 120  
 tgatcgtcac cggcgccgtg ctccgcagca ggtacgcctg cgtcacgttg atcgacgagt 180  
 acctgaacga tccctgtggg ttcggcctcg ccgctccggc actcaggttc cacctgcccc 240  
 atgcaaaaaa ccaaaaccca aaagcttaat gcgaataata catcattcca cgtattttaa 300  
 aaaataatTT ataggtaaaa tttttataat gtatttttagc gacgtaaag tcaatgctga 360  
 gaaataaacg ataatacttt aaatgaagtt ctaaaattta aattttggca tcggttgatg 420  
 ttggataaag aaaacgatgg aggctagtaa tttttcttct tttttaagta tctagattgt 480  
 catatattga atttttcagt tttcatccc ttgaggaca atccaactat tattttcctt 540  
 ttcttatgta aaaggttgaa caacatattc aaacataaaa aaataaaatt aaatgaaata 600  
 aatttacaat tcataaaatt tacagaattt atgttaagaa aatattcaaa cttagataat 660  
 aataaagcaa caaaatcgta ctaaaaagaa gtataattgt acattgtata ctactactcc 720  
 tacaatttta gacttagaat ttttaatttc ctgaaatcta gtaatgcat ttttttcttt 780  
 ctagttgaac cagacagtaa gtttaactcg aaacttataa gctaatgagc gaagtcgggc 840  
 aattcactcg tacctgacgg agcgagcttg gttcatggag aaggacttgt cgaactggtc 900  
 ctgggggaggg tcgggggagcg ggccggaggc ccgcccccg gagttggagt agcggaggac 960  
 ggcgacgccg gcgacgcggc gccacacggt gtcgttcacc atgcgcgcgc tggcgacgac 1020  
 gtagtagtcg gagctcgcgt tctggtcggg ggtgacgagg aaggagtagg actggccgac 1080  
 gtggacgtcc aggttggtgt agttctgctg cgtcgtgtag gagccctccg tctccaccag 1140  
 caccatgttg tgcccctgga tcctgaagtt gaggtcgtc gacgtcccca cgttgtgcac 1200  
 tcggatcctg tacgtcttgc ctgtgtcccc acaccgacgt cgccgacaca cgcgcaaaag 1260  
 ataatagact cattgtaagt aggtagtaac cttctccgtt tcatattata aatcgtttga 1320  
 ttatatTTTT gttagttaaa cttctttaag ttttttttct ataaacttaa ttaaacttaa 1380  
 agaattttta taaaaaaaat caaacgactt ataataaaa atggatggag tagttgcac 1440  
 aatttgtgga tgaagcaaac aagattatat cttttcatg agggtgaaag tattcagtga 1500  
 acaattcgtc agtttcaagt ttcattgaaat cggacagggt ctctgaaagt ctgtattttt 1560  
 ggtactgttg gattgactac tctggcttct gttgtcacat cttttgtatc ctagtttcgg 1620

taaaaaaaaat tttggcattt ttactcctat cgttgatctg ttttaactgaa accattgcat 1680  
 gatatactac tagcagacaa aactggtgaa aattcacgag aatgaacttt ttgtcagtta 1740  
 agcattagcg gacagcttca gtaagcagag caggctgcct taaggcttaa agcactatct 1800  
 tccacaacac tttgtcctac aatcaaattc caaatttact atcacaaaaa gcgaaggaac 1860  
 taactaaacc ttactcctac tagtactact gctatgacta tgaaacaaga ttccaatcca 1920  
 aagaaaacac agtgctcgat cagcatgata aaagcaacga aacctgctca tccagctgcc 1980  
 aaaatgccac cccactgact ctacgtacgt actacgtatt gacgctgtaa aaaactagcc 2040  
 gtagtacaga gaagaggacc caaagtttcg tcaaaaattt tattttaccc ggatccacat 2100  
 tgatgggtctc gtactcgatg ccggccggga caaggctgtc gttgtacctg tacgggccct 2160  
 tgccgttaat cagcacgccg tccggcatcc cgaggctcct gccactgtcc agcatcttcc 2220  
 tcagatcctg caacgaattc 2240

<210> 20

<211> 2601

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker C1361 MwoI

<400> 20

tcttgctgag atccaagttg cggtaacttt gcccttttct ttttttcttc tcttctgaat 60  
 tttttcatgg tttttgggag agattttcgt aacttgatta cagttctagg aaaaggccac 120  
 cttgttcaaa cagggctttc ttgaaaggga tcaatttgct aggagtacat gattctaaaa 180  
 gcgatttcga aataaaacac agttctcgat ctcatacctg aaaacaaaag gcccatactg 240  
 tgtaaactgt gattatgctt ctgttaaagtg ggatatttgt acaaaattga cgccaaccac 300  
 ctataaacag attgtgagct tttatcttag taaaataaaa tgtgacattc tactcagtgt 360  
 tcagtgatec gatgtcgtct cttctgcgta caacttctaa cagccgtttt cggtagtaca 420  
 aactagcgaa acaccaaaaa cgcagcattt gagttctgga atacgctgaa attggttagaa 480  
 tcaaccacga aaccaaatac attgttcaga aacgttgcaa cgagataaaa cacaagaact 540  
 tgttttaaca aagcatagcg acagtacata tacggttaca acaccagtc tttatacagt 600  
 tctgctggag ttccatctac tggctgtcat tgtatctcag gacagacagg ttaacatagg 660

tacaacacaa ttacaggcta aaccgaagcg aactacactg tcagcatctc taacagtatc 720  
 gtcaagcaag cttattttaca gctgctctag taaattttaca acgtccctgg cagaatccct 780  
 ctcgttttctg gcagcgacga ggcacgggtcc atggccttag caggacatct caccgcgtcag 840  
 ctgcatagaa agcaaccgac ttcagtggaa tcacctcctg ctcttgcaaa aaagttgggtt 900  
 cgatcaatca cgcgtttaat ccaaaacaaa atgggtatta attatgctag cctatgaagc 960  
 tacctcagag ttctctatctt gctctgcagg gaaatgaagt ccagtggaa agttctcaag 1020  
 cacctcaggg ctcttcaccc atgctttgtg tgcttcaatg gctttcagct tatagcgaaa 1080  
 catctgcgat acggatctaa aattaaggat gtcgacaatt acttaacaca acaataatt 1140  
 gaagcaggtc cagttaaaga aaagtagcag cgaagaatag cactctgaag tctgaacctc 1200  
 agataaagaa atggttgggtt ttccagttc atctccctca acatggattc cagtaccctg 1260  
 gcattctggg caaaggatgg atgttatctt cttaggtgca tttttgcct ttcttctcgt 1320  
 attgcttttt cccttgcttg caattttgtc tgctagcatc tcatattggc ataaaatagt 1380  
 ccagtgcaca aggcaagaag tgtgaaacaa atgaaatgcc tgcaaaatta gccgtacaaa 1440  
 gtcattggag gttgcagcag aatactacaa atttttaag aagaaactat aactgtctc 1500  
 tgttttgctt gaaatgaatt caaccacttt gcattatacg gtttggaatc cctggtttgt 1560  
 gagaactgta attccattac aacagtgaag aagttaccat aactaatgaa tggaaattag 1620  
 tcaaatgcct aatttttttag gtttgcttta atttatctat ctgtgagaaa tgctaagcat 1680  
 gtcattgcgtt gctatcttca agaaatacta agaaactgca aaggcaaaga atgtttgaaa 1740  
 taacttaccc cgcttgagtt tctactgctg caggctagat ttcctgtctt gcagttgagc 1800  
 aaggtagcta catccttttc aagaagcatt ggtcgccac aaatatcaca agctttctca 1860  
 gcagcaaggc gcttctgctt acgcaactcc ctctcatag atttggtgga taagaggcca 1920  
 acttgaagat tgtgtgaagt acctgtcggg gaacctgtta tgatagcttg gctattgtca 1980  
 tgggceggagc tgctttgctc attcgactcc tctgaagatg cttcttgatc tgaaaatgac 2040  
 ttctttcttc tctttccacg gtgtccagca tcatcaatca cgaagaaaga tccagcagag 2100  
 ataggaaggt cctgatcatc agaagaccac ttctgccc aactcaattgt ataagagaag 2160  
 ttgacaatgg caaagtcaga ttgctcatag gtgtcacact catccaagcc atgggagcca 2220  
 tctgtccta cccaagcaca ccagatcttg ctaatctttt tacttctttt gctagcttcc 2280  
 cataacctgt atgcaatatt tccatatccc aaaagatgca caggcaaate cgaacaaca 2340  
 tccttttagca atacactagg aataacgaga ggaccgtcag ttccactttg gtttgacagc 2400

acatgatcctt cagatacaga agcagttcta ccattacat gcgcatttgc accacggcgt 2460  
 gtgccttttg cgccattgcg agagctagaa tcattctctca acctcgaagt cacttcagtg 2520  
 tcgttcgctg gaaccagagc cagctctctg gtgttctgcg agctcgagtc cagcaagagc 2580  
 gggtccttct cgcgcgagtt g 2601

<210> 21

<211> 1333

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker G2155 MwoI

<400> 21

ccctctgctt gatccagtgt acatccatgg gttaggacag attagttact cagttaatta 60  
 agtgtgagac tggaaaaaaaa tatctgacgg cagttttata agttgagtga ttgaactagt 120  
 gaaagttcag ttaactgtca acggctgtag atttgggatg gcagactgtt ctgagtcaaa 180  
 atgaagcttt tactgtgcgt ggttaccagg tgcagtaaaa taatttcaga tctaactgca 240  
 gtaaaaaaat gtagtactat atgttaagac gagattggtc ggtcaaaatc tatctggccc 300  
 ttacatctc ccaaagtta cctcagttgc aggttggtaaa aaaaaatcac tcgtttcacg 360  
 tgatgtcggc agatcatgga ccatgtctca aatgctgaaa ctctgaacaa tcaacaaaaa 420  
 aatccaacca gatgagctgt gcaactgata attgatcatc aactatttg caactcatct 480  
 ttcattgtaga tggaacttca atcccgaaga aataatgaca gcaaaatgct gcgatcctga 540  
 agaaaggatg gcggaacaaat ggcagcgata aaaaaaaaaat ggttggttac tgaagaatta 600  
 tttgtgcagc agttgagaca gtagcaagat aagagctagc taagctagct aggttagagtt 660  
 ggatggaaga gtagtagtat gagatagagc atggagcgcg acaactcaag tggatgctaa 720  
 agtaaaaggc attctcttct cttgtttgga atcagaaaag aaaagaaaag acttgagctg 780  
 cttggctgga atgtttggtt ggatcatgcg cgctctcctt agcttagctc gccaaagaaat 840  
 cctcgcttca tctctctcaa taattcaaag ccacgagctc tctgctcata tccagtgcga 900  
 cgattcccggt taatgcaaat gcattatata cagttcgaaa tgttacaatt cttgcgtttg 960  
 cagcaagcca gcaagtgggtg tgaattgttt aatccctcgt gcatttcaac gaaattctct 1020  
 cacaatttcg cattgacttc tttcttagca caattagtaa gcagtgacaa ataaagaatt 1080

tttgaacagg atgtctttcc aaggaagtg agatttttta tgtggatagc aaggatcgcc 1140  
 tttccttagc atgaagagaa tgtgatcaac ttacacctt gcttacgatt atggccttaa 1200  
 tttttgatac cctaaacagg agcacatcac atgcatgtcg acctgagacc accaattaac 1260  
 tgattaagtt ggcatttcag atgcatccgt cagttacatg atcaggtgat cgatggatca 1320  
 actgtaggtt tca 1333

<210> 22

<211> 863

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker G291 MspI

<400> 22

cgaacaggat caaaagtaga cgacgagggc atttagaagg agaggaattg tatttgttcc 60  
 cggatatttaa tttttaaat tgtggtcgga agtttcggaa gaaaaaatgt gctcatgagt 120  
 gattattggc tctgaacacc aacctctctt ttcgttgatt cttcttgagg tgttgggtgt 180  
 tgggacacga tgctgccgcc gacacgacac cgggttcac aatacactaa tctactcgcg 240  
 acaccttcat tgaactgcat ataattattt agaaagtcca ttaacacatc ttataaaacc 300  
 ttgttgaatc atataatcat tctataaagt ctatttgaac atcttatgaa aaaataagat 360  
 ctgacctagt cgttacactc tcttacattt tccattagcc taactaattc cgtgcaggaa 420  
 acgccccaaa ataatagtag caatagtcca ctaatcccggt gccagaggcc gccaatgatt 480  
 agtgattaac ccaaaaaaca taatcatcat cacacgccgc taatgaccag ctctcgetta 540  
 gctcatccca caggcggccc ccacacgcca ctctgccat gtgggcccac ctttcacacc 600  
 cccaccaac cagaaaaaaa actcccccaa aaaaaaact tttaatgctt atctcgcggc 660  
 agtataaaag gcgacccac caccacaca caatcacagt cagcgacca acccaaccgc 720  
 agccgaggag tcgagtcgtg tgaaaattac gaaattgccc ttcgactcca ccaccaccac 780  
 ccaccggcga ggcgaggaga ggagaaaaat tgggaggaaa aaaaaaggga aaaagaaaaa 840  
 gggtaggaga gatttttgcg aag 863

<210> 23



&lt;211&gt; 1510

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker R2303 BslI

&lt;400&gt; 23

```

tgccatgaag acctatggaa agaatatctt cttctcactc tgtgaatggt gagtttactc 60
tctgtaacat ttagggctag gtcgaaggaa catgaagcat tgctgattca ctccactgtg 120
tttttttttt ctgtataggg ggaaagaaaa tcctgctaca tgggcaggcc gcatgggtaa 180
cagctggaga acaactggcg acatcgccga caactggggc aggttctact catcctctct 240
ttaaccctgt ttacatagtt cttgagtttt tcagtactga tcgtaattgc cctgtttatt 300
cagtatgaca tctcgtgcag acgaaaatga ccaatgggct gcctatgctg gacctggtgg 360
atggaatggt aagaacttga gatgtatctg ttcctagggt gcttaaccat ttgagagctt 420
caaatgatac aacatatgtt tctgctgtgc aatatcagat cctgacatgc ttgaagtggg 480
aaatggtggg atgtctgaag ctgagtaccg gtcacacttc agtatctggg cactagcaaa 540
ggtaccatag catgtttctat gtactaataa ttttgctgca atgttgaact tctttgcatt 600
tcctcactgc aagttttgct tgaattgttc aggctcctct tttgatcgga tgcgatgtgc 660
gctcaatgag ccagcagacg aagaacatac tcagcaactc ggaggtgatc gctgtcaacc 720
aaggcaagcc ttctcagttt cacatgctta gatttagcca tacctcttgg atatttcacc 780
atactcataa tgtaactctc tgaacagata gtctaggtgt ccaaggaaag aaagtacaat 840
ctgacaacgg attggaggta tcccttcaat ggcttccaaa tttgcagttt ctcattgtcc 900
cataagcctt ggcatgatca tgactaactc tgaagctgac aatactttgt gtaaatttgt 960
cggttaggtt gggccgggcc actcagcaac aacaggaagg ctgtggtgct ctggaacagg 1020
cagtcatacc aggcaaccat cactgcacat tggtcgaaca tcgggctcgc tggatcggtc 1080
gcggtcactg ctcgtgatct atgggcggta aagcctttgc tttcttcaga gctcaaagta 1140
gaacatcttc tcttcagaat tcagagttca taacaaattt ctgtcaattg tgcagcactc 1200
ttcgttcgcg gctcaggac agatatcagc atcgggtggcg cctcatgact gcaagatgta 1260
tgtcttgaca ccaaactagt cagcaaagaa aagcagcaca ggtagtacg tgtccggcga 1320
atacagctaa attgatcagg attcaggaag aaggtttgca atttgcaagg attggtagag 1380
ctggaaatgg gatgccattt ggttatgtat gtagaaataa gctgtaagcc tgtaagcgta 1440

```

tatgtaatca gccgtcaaat gctggcgagt gtatttctga agtttgcaac gaaagttgca 1500  
gcaataaaaa 1510

<210> 24

<211> 1016

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker BstUI

<400> 24

tggggattct tttctttaag caatttaaca ttattgtcct aacaatatac acaatattgg 60  
tttttctttc agtatcaaat aattctttta cttttgaaaa cacatttgca atgtgttgga 120  
aacacaatta tatcttgcaac ttccttttgg aaatttaate atttgaaaac tgattcgcggt 180  
ttcatggctg taatctttctc ttgcgaacat cgctctttct ttgatggttc tctgttgaga 240  
agaagagcaa ccaagtaaata tttcgaaatg tttttttgtt ctttctattc accattgcag 300  
gttgtcaaag ccatcgagaa ggccataaccg attccgagag cgcaacccat tgccttgga 360  
ggcccagcaa gggaagagct gaaggccatg gaggcgcaga aggtcgagat cgaccgcacc 420  
gcggcgctcc aggtgcgcgg tgagctttgg ctggggctgg catacctcgt cgtccagact 480  
gccggcttca tgaggctcac attctgggag ctctcatggg atgtcatgga acccatctgc 540  
ttctatgtga cctccatgta cttcatggcc ggctacacct tcttctcccg gaccaagaag 600  
gagccctcct tcgagggtt cttcgagagc cggttcgcgg cgaagcagaa gcggttgatg 660  
cacgcccggg atttcgatct ccgccgtat gacgagctcc ggcgagcctg tggcctgccg 720  
gtggttcgga ctccgacgag cccctgcaga ccgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcttcgacg 780  
caggagagcc attgccattc ttactgccat tgccaatgat ctttgtgctg ttctgttctg 840  
ttgtcagaat tttttcatgc ccagtttatg ggggttaagc tagcttctcc attgtaccgt 900  
tctgatgtgc ggatgatgcg atgcaaagca tagtttgttg aagagatgac aaggcagatt 960  
ttagcttgaa aacctggagg tgagaaaaaa aaatcctgat gtgtttgtgt gtgtga 1016

<210> 25

<211> 676

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker S10602 KpnI

&lt;400&gt; 25

```

accaccttca tatgaagaaa ttaacggtgt tttcatgagg aatccaacag tcgctgaatt   60
ggtggaaact gtggaattct tcttggctga ggtaaccaat catcacttca ccacaatgca  120
caagtttgta gcttactact acagtacttc taataagttt tgtctgttga gattttattg  180
ctgattttcta tgcatgggtca tcttttttgac aggccatcca gtcttatcgt gctgagagtg  240
aaactgagct caacctggca gctgggtgact atatagttgt ccggaaggta cggccctatc  300
ttcccattgg acatgtttct aaccataaac atatctttgc tggacttttg tgggcaaagt  360
tggctacact aaacttgtgt tcattaacct gctcaatcag gtgtcaaaca atggatgggc  420
agaaggtgaa tgcagaggga aagctggctg gttcccttac gactacatcg agaaaaggga  480
ccgtgtgctt gcaagtaaag tcgcccaggt cttctaggcg ttcaatgagc catacataca  540
taaccctggg gttgtacact gtattatgat cgttcgtgat cttcaaagac cctctgatca  600
gagaaatcac aaatattctt ttgttctatt attgtcatta tcactacccc ttttgtcaaa  660
accagtgcag cctttt                                     676

```

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 1059

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* L.

&lt;223&gt; PCR marker Tsp509I

&lt;400&gt; 26

```

gcgagatcat gaacttgatt ttctgggtgc catattgggc ttgcttggtta accttgtaga   60
gaaggatagc cttaataggt aagtcctca catgcttcct tccatttgct caattcatat  120
cagtgttact gttctggcag ttccttgggg tcaggactca gaaacatcca attaattgtc  180
atgtttctctt aacgactcag aaatacttta taacctctcc acagggtacg gctttcatct  240
gcccggtgtc ctgttgatct atctcagaat ccacagagtg aagagacaca gagagatgtc  300
atagcactcc tctgttctgt attcttagca agtcaagggt ctagtgaagc ttctggaact  360

```

atatcaccgg taattcaaaa ttcttcaagt tccttttgta tgtagattat atctttgtaa 420  
aactcggcat ttattacctg ctctttgttt caaaaagcag ttttttattt tgctccttag 480  
cataggtcag cagaacagtt gatcttattc agaaaacaat attttgcattg taacatactg 540  
ttatctatga gatgaaaatt aatgcatgtg taataatgtc aatgataaat atttgctatc 600  
tgaatccagt ctaccaactc tagttagacc gaattactga ggttctattt caaagaataa 660  
tttagtgcac cttttgttca actactatga agtaaaatgg tttcccttc ttttgacatc 720  
gggttagaag tgaaaggcca tcttaatgcg atgttctcaa tgccacaaac ccacaaattt 780  
cattaacaca tacagattat tattaacata gctataaatt ggatttccag aagcttgagt 840  
tgaatttatt ttgttacaat tgaaagcact gggaacatta gcattttttt ttagttcttg 900  
gttattgcaa ttataatgt tatacagaac tgtgtacctc acaatgcatt cattatgaca 960  
ttctatgaac cttttgattg actgttgctt gtaaacaaca ggatgatgag gaggctttga 1020  
tgcaaggagc acgggaagct gaaatgatga tcgtagagg 1059

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68 // A01H1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, A01H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKUTA. Y et al., "Linkage analysis of the restorer gene (Rf-1) in rice using restriction fragment length polymorphism markers", Jpn. J. Breed, (1992), Vol.42, pages 164 to 165	1-6
A	JP 2000-139465 A (Mitsui Chem. Inc.), 23 May, 2000 (23.05.00), (Family: none)	1-6
A	JP 7-222588 A (Mitsui Toatsu Inc.), 22 August, 1995 (22.08.95), (Family: none)	1-6
A	JP 9-313187 A (Mitsui Toatsu Inc.), 09 December, 1997 (09.12.97), (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
02 November, 2001 (02.11.01)

Date of mailing of the international search report  
13 November, 2001 (13.11.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, //A01H1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	FUKUTA. Y et al. Linkage analysis of the restorer gene (Rf-1) in rice using restriction fragment length polymorphism markers. Jpn J. Breed, 1992, Vol. 42, p. 164-165	1-6
A	JP 2000-139465 A (MITSUI CHEM INC) 23. 5月. 2000 (23. 05. 00) ファミリーなし	1-6
A	JP 7-222588 A (MITSUI TOATSU INC) 22. 8月. 1995 (22. 08. 95) ファミリーなし	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 11. 01

国際調査報告の発送日

13.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光木 美奈子

4B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 9-313187 A (MITSUI TOATSU INC) 09.12月.1997 (09.12.97) ファミリーなし	1-6